

⑫ 公開特許公報(A) 昭62-244399

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 Q 1/68

A-8412-4B

C 12 N 15/00

7115-4B

G 01 N 33/50

P-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 5 (全28頁)

⑮ 発明の名称 競合的均質検定法

⑯ 特 願 昭62-3905

⑰ 出 願 昭62(1987)1月10日

優先権主張 ⑱ 1986年1月10日 ⑲ 米国(US) 817841

⑳ 発 明 者 ラリー・エドワード・ アメリカ合衆国イリノイ州60532, ライスル, スベンサー  
モリソン 4913

㉑ 出 願 人 アモコ・コーポレーシ アメリカ合衆国イリノイ州60601, シカゴ市イースト・ラ  
ヨン ドルフ・ドライブ 200

㉒ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外5名

明細書の序言(内容に変更なし)

明 細 書

とができる; および

1. (発明の名称)

競合的均質検定法

(a) 該試料中の環状の存在と関連がある信号の存在について該試料を監視する工程;

2. (特許請求の範囲)

から成る環状のポリスチレオナドについて試料を検定する方法。

(1) 次の工程:

(a) 試料と試薬を結合条件下で接触させる工程、

(2) 第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端に存在し、第2標識成分は他方のプローブの5'末端に存在する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

ここで上記試薬は第1ポリスチレオナドプローブおよび第2ポリスチレオナドプローブを含み、第1および第2ポリスチレオナドプローブはそれらが互いに結合する第1の位置をとることができ且つ上記プローブの少なくとも1つは該プローブ鎖が環状のポリスチレオナドと結合する第2の位置をとることができ、上記の第1プローブおよび第2プローブはこれらのプローブの一方と会合した第1標識成分および他方のプローブと会合した第2標識成分を含み、或第1および第2標識成分は第1および第2プローブが互いに結合するとき相互作用して上記2つの位置の一方にあるプローブに特徴的な検出しうる信号を発すること

(3) 各プローブは複数の標識成分を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

(4) 上記標識成分はそれぞれ上記プローブの末端に存在する、特許請求の範囲第3項記載の方法。

(5) 第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端にあり、第2標識成分は他方のプローブの5'末端にある、特許請求の範囲第3項記載の方法。

(6) 第1標識成分は核酸のアミノアルキル誘導体により上記プローブと会合している、特許請求の範囲第2項記載の方法。

(7) 上記誘導体はアデニンのアミノアルキル誘

導体を含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

(8) 上記誘導体はアデニンのアミノヘキシル誘導体を含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

(9) 上記誘導体は8-(6-アミノヘキシル)- $\alpha$ -アミノアデノシン-5'- $\gamma$ -モノホスファートを含む、特許請求の範囲第6項記載の方法。

(10) 3'末端にある上記標識成分は核種の蛍光性誘導体である、特許請求の範囲第5項記載の方法。

(11) 該標識成分は1-N<sup>3</sup>-エチノアデノシン-5'- $\gamma$ -モノホスファートの誘導体を含む、特許請求の範囲第10項記載の方法。

(12) 次の工程：

(a) ポリヌクレオチドと核種のアミノアルキル誘導体とを反応条件下に除去ターミナルトランスフェラーゼの存在下で反応させる工程；

および

(b) アミノアルキル誘導体のアミノ基をアミン反応性成分と反応させる工程；

から成るポリヌクレオチドの3'末端にアミン反応性成分を結合させる方法。

プローブを製作することから成る上記方法。

(13) 増幅手段はプラスミドおよびファージ粒子を含む、特許請求の範囲第16項記載の方法。

(14) 上記セグメントは単離した後に制限酵素で消化してサブセグメントとなし、該サブセグメントを標識成分と会合させてプローブを作る、特許請求の範囲第16項記載の方法。

(15) 上記セグメントとヌクレオチドのアミノアルキル誘導体とを反応条件下にターミナルトランスフェラーゼの存在下で反応させ、該アミノアルキル基を標識成分と反応させることにより、第1標識成分を3'末端と会合させる、特許請求の範囲第16項記載の方法。

(16) 上記セグメントと二官能性アルキルアミンとを反応させてアミノアルキル基を含むセグメントを形成し、次いで第2標識成分を該アミノアルキル基と反応させることにより、第2標識成分を5'末端と会合させる、特許請求の範囲第19項記載の方法。

(17) 標的ポリヌクレオチドについて試料を検定

(18) 上記アミノアルキル誘導体はアデニンのアミノアルキル誘導体を含む、特許請求の範囲第12項記載の方法。

(19) 上記アミノアルキル誘導体はリボヌクレオチドである、特許請求の範囲第12項記載の方法。

(20) アミノアルキル誘導体は8-(6-アミノヘキシル)- $\alpha$ -アミノアデノシン-5'- $\gamma$ -トリホスファートを含む、特許請求の範囲第14項記載の方法。

(21) 第1プローブおよび第2プローブを含む、該第1および第2プローブは第1プローブが第2プローブと結合する第1の位置、および上記プローブの少なくとも1つが標的と結合する第2の位置をとることができるポリヌクレオチドプローブを製作する方法であつて、

増幅手段中に標的配列と実質的に同一の塩基配列をもつポリヌクレオチドセグメントをスプライシングして、該ポリヌクレオチドセグメントの多数のコピーを形成し；該セグメントを単離し；そして該セグメントの末端に標識成分を会合させて

するための試薬を含むキットであつて、

上記試薬は第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含み、該第1および第2プローブはそれらが互いに結合する第1の位置をとることができ且つ上記プローブの少なくとも1つは該プローブ類が標的と結合する第2の位置をとることができ、上記の第1プローブおよび第2プローブはこれらのプローブの一万と会合した第1標識成分および他方のプローブと会合した第2標識成分を含み、該第1および第2標識成分は上記第1および第2プローブが互いに結合するとき相互作用して、上記2つの位置の一方にあるプローブに特徴的な検出しうる信号を発することができる上記検定用キット。

(22) 第1標識成分は上記プローブの一方の3'末端にあり、第2標識成分は他方のプローブの5'末端にある、特許請求の範囲第21項記載のキット。

(23) 各プローブは複数の標識成分を有する、特許請求の範囲第22項記載のキット。

(24) 上記標識成分はそれぞれ上記プローブの末

端に存在する、特許請求の範囲第23項記載のキット。

四 第1標識成分は3'末端にあり、第2標識成分は5'末端にある、特許請求の範囲第23項記載のキット。

四 試料中のポリヌクレオチド標的について総合的均質検定を行うための装置であつて、

試薬および試料を収容するのに適した容器手段、ここで該試薬は第1プローブおよび第2プローブを含み、該第1および第2プローブは第1プローブが第2プローブと結合する第1の位置およびこれらのプローブの少なくとも1つが標的と結合する第2の位置をとることができ、これらのプローブは一方のプローブと会合した少なくとも1つの標識成分および他方のプローブと会合した第2標識成分を有し、該第1および第2標識成分は上記プローブが第1の位置にあるとき相互作用して、該標識成分の一方の励起の際に上記位置の一方に特徴的な信号を発することができる；

上記標識成分の一方を励起する手段；および

本発明は係属中の米国特許出願第738560号(1985年5月28日付)および同第284469号(1981年7月21日付)の一併継続出願であり、これらにここに参照により引用される。

次の定義は本発明の理解を促すために与えられる。本明細書で用いる“生物学的結合対”という用語は、相互親和性または結合能を示す分子対を意味する。“リガンド”という用語は、本明細書において、生物学的結合対の一方の分子を意味し、そして“抗リガンド”または“受容体”は生物学的結合対の他方の分子を意味するだろう。例えば、検定するものではないが、本発明の実施態様は生物学的結合対が2つの相補的なポリ核酸鎖を含む検体ハイブリダイゼーション検定に用いられる。これらの核酸鎖の一方がリガンドと呼ばれ、他方が抗リガンドと呼ばれる。しかしながら、生物学的結合対は2、3の名を挙げれば、抗体および抗原、抗体および抗原受容部位、ならびに酵素および酵素基質を含む。

上記信号を検出する手段；を含む上記装置。

四 標識成分は蛍光団であり、標識成分の一方を励起する手段が光源を含む、特許請求の範囲第26項記載の装置。

四 少なくとも1つの標識成分が化学発光剤であり、標識成分の一方を励起する手段が上記容器に化学発光補助因子を導入する手段を含む、特許請求の範囲第26項記載の装置。

四 上記検出手段は光検出器を含む、特許請求の範囲第26項記載の装置。

### 3. [ 発明の詳細な説明 ]

#### 産業上の利用分野

本発明は標的分子の検出および定量分析において有用な方法、試薬、組成物、キットおよび器具に関する。特に本発明はデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) のハイブリダイゼーション検定を行うための方法、試薬、組成物およびキットに関する。

#### 従来技術

“プローブ”という用語は標的リガンドと選択的に結合できる既知性状のリガンドを意味する。核酸に適用するとき、“プローブ”は標的核酸鎖に相補的な塩基配列を有する核酸鎖を意味する。

“標識”という用語は例えば放射性同位体；酵素；発光剤または染料；および色素を含む検出可能な分子成分を意味する。“剤”という用語は検出可能な応答へ導く反応に與する全ての分子成分を含めた広い意味で使用される。“補助因子”という用語はその剤との反応に與する全ての分子成分を含めた広い意味で使用される。

遺伝情報は生細胞中に存在する糸状のDNA分子に蓄えられている。in vivo においてDNA分子は二重らせんであり、二重らせんの各鎖はヌクレオチド鎖である。各ヌクレオチドは4種類の塩基：アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)およびシトシン(C)の1つによつて特徴づけられる。塩基は官能基の向きにより一定の塩基対が互いに引きつけ合つて水素結合により結合するという意味で相補的である。一方のDNA鎖のアデニンは他方の

相補鎖のチミンと対合する。一方の DNA 鎖のグアニンは他方の相補鎖のシトシンと対合する。RNA では、チミン塩基がウラシル(ウ)で置き換えられ、ウラシルは相補鎖中のアデニンと対合する。

生物の遺伝情報は塩基対配列の DNA 鎖により伝達される。DNA は共有結合されたデオキシリボヌクレオチド鎖から成り、RNA は共有結合されたリボヌクレオチド鎖から成る。それぞれの鎖は 1 つのヌクレオチドの鎖の 5' - ヒドロキシル基と隣接ヌクレオチドの鎖の 3' - ヒドロキシル基との間のホスホジエステル結合によつて結合される。自然界に存在する DNA または RNA の各鎖状態は、遊離 5' - ヒドロキシル基をもつ末端と遊離 3' - ヒドロキシル基をもつ末端とを有する。ポリヌクレオチドの各末端はそれぞれの遊離ヒドロキシル基に関連づけてしばしば 5' 末端または 3' 末端と呼ばれている。自然界に存在するポリヌクレオチドはその 5' 末端にホスファート基をもち得る。DNA および RNA の相補鎖は、一方の鎖の 3' 末端が他方の鎖の 5' 末端と結合する逆平行複

合体を形成する。

核酸ハイブリダイゼーション検定は 2 本の核酸鎖がそれらの相補領域で対合する傾向に基づいている。現在、核酸ハイブリダイゼーション検定は主に完全な DNA 分子中の、または核酸混合物中の、または核酸フラグメント混合物中の、特異な DNA もしくは RNA 塩基配列あるいは特定遺伝子を検出して同定するために使用されている。

組織または培養物試料から抽出された全 DNA または RNA 中の特異な DNA または RNA 配列もしくは特定遺伝子の同定は、生理学的または病理学的症状の存在を示すかも知れない。特に、ヒトまたは動物組織から抽出された全 DNA または RNA 中の特異な DNA または RNA 配列もしくは特定遺伝子の同定は鉄欠赤血球貧血、組織適合性、癌および前癌状態、または細菌やウイルス感染などの症状もしくは代謝病の存在を示唆する。細菌培養物から抽出された全 DNA または RNA 中の特異な DNA または RNA 配列もしくは特定遺伝子の同定は抗生物質耐性、毒物、ウイルスまたはプラスミ

ドに関連した状態の存在を示し、また細菌菌の同定を可能にする。

従つて、核酸ハイブリダイゼーション検定は病気の診断および検出において大きな可能性を有している。さらに、その可能性は植物の病原因子や毒物産生菌を検出するために核酸ハイブリダイゼーション検定を使用する農業や食品加工の分野にも存在する。

最も広く使用されているポリヌクレオチドハイブリダイゼーション検定法の 1 つは、サザンブロットフィルターハイブリダイゼーション法または単にサザン法として知られているものである (Southern, E., J. Mol. Biol., 98, 503, 1975 を参照)。サザン法は標的 DNA または RNA 配列を同定するために用いられる。この方法は一般に対象となる標的配列を保有する可能性のある生物から単離した RNA または DNA 試料を制限エンドヌクレアーゼで消化して、DNA フラグメントを形成することによつて実施される。その後、DNA フラグメント試料はアガロースや

ポリアクリルアミドのようなゲルで電気泳動を行い、フラグメント試料を泳動により分類する。各フラグメント群は標的配列の存在について試験される。DNA をニトロセルロースシートへ移行させるためにゲル内部で変性する。DNA フラグメント試料を含むゲルはニトロセルロースフィルターシートまたはジアゾ化紙 (これに DNA フラグメントが移行して結合または固定される) と接触させる。次いで、DNA フラグメント試料を含むニトロセルロースシートを約 85℃ に加熱して DNA を固定する。その後ニトロセルロースシートを変性した (一本鎖の) 放射性標識 DNA プローブを含む溶液で処理する。放射性標識プローブは標的配列に相補的な塩基配列と検出可能な放射性成分を有する DNA 鎖を結合する。

プローブと DNA フラグメントとのハイブリダイゼーションを行わせる。ハイブリダイゼーション工程の間に固定化 DNA 試料と標識 DNA プローブとを結合させて、再び二本鎖構造を形成させる。

ハイブリダイゼーション法はきわめて特異的である。標識プローブはもしも2つのDNA鎖が実質的に相補的な塩基対機構を共有しないならばDNA試料と結合しないであろう。ハイブリダイゼーションは所定の条件に応じて3〜48時間を経る。

続いてハイブリダイズしなかつたプローブを洗い落とす。次に、ニトロセルロースシートをX線フィルムのシート上にのせて感光させる。X線フィルムは感光面を現像して、DNAプローブとハイブリダイズしたDNAフラグメント(従つて対象とする塩基対配列を含む)を特定する。

核酸ハイブリダイゼーション検定の使用は、X線フィルム上にバンドを視覚化するための長い感光時間によつて幾分か妨げられている。一般的なサザン法は感光のために1〜7日間を要する。さらに、この技法の多くは標識剤として放射性同位体を必要とする。放射性標識剤を使用するには特別の実験手段とライセンスが必要である。

放射性標識を使用する検定法に關係した上記の

その結果結合した標識プローブと結合しなかつた標識プローブとを分離する必要がないという点で“均質な”検定法の開発を可能にする。浸蝕、酵素、発光標識成分を使用する非放射性核標識検定は信頼できるとみなすに足る感度または特異性を与えていない。

発光検定法では、生物学的試料中のタンパク質や他の分子の存在が励起光線の散乱(“レイリー散乱”)を引き起こし、その結果励起光線の波長の約50nm以内の波長で光を発する発光標識との干渉が生じる。内因性の化合物はまた散乱分子に特徴的な比較的長い波長で励起光線を散乱させ(“ラマン散乱”)、また発光標識の発光スペクトル中の光線を吸収し、その結果発光プローブの消光をもたらす。

不均質な発光検定法の感度を改善する試みはいわゆる“時間分解(time resolved)”検定法の開発へと導いた。ツニク(Boni)らのClin. Chem. 29/1, 65-68(1983);米国特許第4176007号を参照されたい。時間

経過問題は、発光分子のような非放射性標識を使用する免疫検定法の開発へと導いた。一般的にはスマイス(Smith)らのAnn. Clin. Biochem. 18:253-74(1981)を参照されたい。発光標識は外部エネルギー源によつて励起された際に光を発し、励起エネルギー源の種類に応じて、例えば高エネルギー粒子からエネルギーを誘発する放射性発光標識;化学反応からエネルギーを得る化学発光標識;励起エネルギーが生物学的系に供給される生物発光標識;および紫外線、可視光線または紫外線の電磁波(光子、フォトン)の単位によつて励起される光ルミネッセンスまたは蛍光標識;に分類される。上記文献の255頁を参照されたい。

非放射性エネルギー源によつて励起される標識を使用する発光検定法は、放射性標識を使用する検定法に伴う健康上の危険性やライセンスの問題を回避することができる。さらに、発光標識の使用は、標識プローブが検定試薬と結合したときに結合しなかつたときとは異なる発光特性を示し、

分解検定法は一般に試料中に存在する物質の自然発光の発光寿命1〜2.0nsecとは著しく異なる(通常はより長い)発光寿命をもつ発光標識を使用することを含む。検定の結合工程を行い、分離された結合標識物質または非結合標識物質をキセノン放電管または他のパルス化エネルギー源から発生する一連のエネルギーパルスにより励起する。各パルスから生じる標識の発光は、試料中のバックグラウンド物質の自然発光の寿命よりも長い時間で測定する。こうしてバックグラウンド散乱および短寿命の試料発光からの干渉が測定発光から排除される。

プローブまたは試料DNAの分離や固定化を必要とするこの技法は非放射性検定の操作を煩雑にしている。発光標識成分の発光は固体支持体によつて低下される。支持物質はバックグラウンド発光源であり得、また発光源を反射しもしくは散乱させて検定を妨害する。ハイブリダイゼーション工程に費する時間は、相補的DNA鎖が相補的結合關係にあるDNA鎖対の一万の固定化により完

念に遊離状態でない場合に増大する。複雑プローブの固体支持体への非特異的結合も検定の精度を低下させる。

#### 発明の要約

本発明の目的は、対象とする標的ポリヌクレオチド鎖の検定を行うための方法、試薬、組成物、キットおよび器具を提供することである。その他の目的は以後に示すであろう。

要約すると、本発明の実施態様は生物学的結合対の構成員である標的分子について試料を検定する方法を包含する。本方法は試料とプローブ(プローブリガンドおよびプローブ抗リガンドを含む)含有試薬とを結合条件下で接触させることを含む。プローブリガンドおよびプローブ抗リガンドは互いに対して第1の結合位置をとることができ、プローブ構成員の少なくとも一方は標的分子に対して第2の結合位置をとることができる。プローブ構成員はプローブリガンド上に位置する第1標識成分およびプローブ抗リガンド上に位置する第2標識成分を含む。第1および第2標識成分はプロ

模出しうる信号を発することができる。試薬と接触させた試料は、試料中に標的ポリヌクレオチド鎖が存在することと関連する信号の存在について監視する。本方法は固定化工程を必要とせずに、また放射性標識技術を使用せずにポリヌクレオチド試料を検定することができる。

好ましくは、少なくとも1つの標識成分は一方のプローブの3'末端に存在し、そして第2標識成分は他方のプローブの5'末端に存在する。各プローブに対して複数の標識成分を使用することができ、好ましくは2つの標識成分(各末端に1つずつ)を使用する。例えば、第1標識成分は3'位置で第1プローブと結合し、第2標識成分は5'位置で結合する。類似の標識成分の構成(すなわち3'位置に第1標識成分および5'位置に第2標識成分)をもつ第2プローブは、相対するプローブの第1および第2標識成分がきわめて接近して相互作用することができるように、第1プローブとハイブリダイズするであろう。

本発明方法の実施態様は、増幅手段中に標的配

ーブリガンドおよび抗リガンドが第1結合位置で存在するとき相互作用して、2つの位置の一方にある試薬リガンドおよび抗リガンドに特徴的な模出しうる信号を発することができる。試料は標的分子の存在と関連した信号の存在について監視される。

本発明の実施態様はさらに標的ポリヌクレオチド鎖について試料を検定する方法を包含する。本方法は試料と試薬(第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含む)とを結合条件下で接触させることを含む。第1および第2プローブはプローブ同士が互いに結合する位置をとることができ、プローブの少なくとも一方はそのプローブが標的ポリヌクレオチド鎖と結合する第2位置をとることができる。第1および第2プローブは一方のプローブに位置する第1標識成分および他方のプローブに位置する第2標識成分を含む。第1および第2標識成分は第1および第2プローブが互いに結合したとき相互作用して、2つの位置の一方にある試薬類に特徴的な

列と実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドセグメントをスプライシングして、試薬ポリヌクレオチドセグメントの多数のコピーを形成させることによる追加のプローブ作製工程を含む。好適には、増幅手段は細菌中に組み込んだときに増殖する高いコピー数のプラスミドまたはファージである。標的配列と実質的に同一の塩基配列を有するポリヌクレオチドセグメントは細胞成分、および望ましくない細胞、プラスミドまたはファージDNAから単離し、制限消化してセグメントとなす。その後、セグメントは標識成分を付加してプローブを作製するために利用される。

さらに、各プラスミドまたはファージ誘導セクションは制限酵素で消化して、標識成分をあらかじめして結合できる多数のサブセクションとする。各サブセクションは標的鎖の代表的部分とハイブリダイズすることができるであろう。プラスミドまたはファージ由来の多数の試薬プローブはより優れた信号発生源をもたらし、効率よくかつ比較的安価にプローブを提供するであろう。

本発明の実施態様はさらに、DNA鎖の3'末端を非放射性標識するための方法およびその結果得られる組成物を包含する。その組成物は該鎖のアミノアルキル誘導体を有するDNA鎖を含む。標識のアミノ基はアミン反応性標識成分と反応することができる。好ましくは、そのアミノアルキル誘導体は脂肪族の第1アミノ基を含む。より詳細には、好適なアミノアルキル誘導体は酵素ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ(TdT)によつて試薬鎖に結合し得るアミノヘキシルアミノアデノシン三リン酸のようなリボ核酸誘導体を含む。

ターミナルトランスフェラーゼは一本鎖DNAの末端に1つまたは2つのリボ核酸誘導体を付加して、それにより信号強度を標準化するために大きさによつて分類しなければならず且つ立体効果に寄与しうるデオキシ誘導体の尾部に本発明の標識はエネルギー転移のための適当な立体関係または衝突の相互作用をもはやもたない。しかしながら、

一部に特徴的な検出しうる信号を発することがきる。

本発明の実施態様はさらに、本方法に従つて検定を行うための器具を包含する。標的がポリヌクレオチドセグメントである場合、その器具は試薬と標的を実質的に混合した均質状態に収容するための適した反応室を含む。試薬は第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含有する。第1および第2プローブはそれらが結合条件下で互いに結合する第1の位置をとることができ、これらのプローブの少なくとも一方はそのプローブが標的と結合する第2の位置をとることができる。第1および第2プローブはこれらのプローブの一方と結合した少なくとも1つの標識成分および他方のプローブと結合した第2標識成分を有する。第1および第2標識成分は第1および第2プローブが第1位置にあるとき相互作用して、2つの位置の一方に特徴的な検出しうる信号を発することができる。器具はさらに信号を検出するための適当な検出手段(例えば発光剤の

尾部は尾部上の標識成分が"サイレント(silent)"である場合に良好であり、例えば多くの消光剤は消光剤のより大きな局部濃度ゆえにより大きな消光活性をもたらす。しかも消光剤が非蛍光性である場合には増大したバックグラウンドを示さない。

本発明の実施態様はさらに、生物学的結合対の一部である標的分子の検定を行うためのキットを包含する。標的分子が特定の塩基配列を有する核酸のセグメントである場合に、キットは第1ポリヌクレオチドプローブおよび第2ポリヌクレオチドプローブを含む試薬を包含する。第1および第2プローブはそれらが結合条件下で互いに結合する第1の位置をとることができ、これらのプローブの少なくとも一方はそのプローブが標的と結合する第2の位置をとることができる。第1および第2プローブは一方のプローブと結合した少なくとも1つの標識成分および他方のプローブと結合した第2標識成分を有する。第1および第2標識成分は第1および第2プローブが第1位置にあるとき相互作用して、2つの位置の一方にあるプロ

場合に光増増倍管)を含む。

蛍光検定において使用するのに適した本器具の態様は適当な標識助剤手戻(適切な波長を定めるフィルターを備えたレーザーまたは光-放射装置、または化学発光剤や酵素剤の場合には補助因子を注入するための注入装置など)を含む。

好適な器具は光を反応室へパルス化し、エネルギー転移により生じた蛍光の放出を選択的に読み取つてバックグラウンド蛍光を減らすための時間分解制御(time resolved control)を含むであろう。

#### 好適な実施態様の説明

今や本発明の好適な態様を模式図によつて示す図面を参照すると、特に第1図では、必要な試薬組成物と共に、標的ポリヌクレオチド鎖の検定方法が模式的に示されている。慣用の検定法において、1つ以上の標的鎖および1つ以上のプローブ鎖を用いて検定が行われる。しかしながら、単純化して本発明をより理解しやすくするために、図面では単一の試薬セグメントと単一の標的セグメ

ントのみを示す。

第1図はハイブリダイズした又は相互に結合した第1位置にある第1および第2ポリヌクレオチド鎖ブロープ(それぞれP1およびP2)を示す。また、対象とする2つの相補的な鎖の類から成る二本鎖DNA(それぞれT1およびT2)を示す。第1ブロープ(P1)は各末端に2つの標識成分(A1およびD1)を含む。第1標識成分(A1)は第1ブロープ(P1)の5'末端に共有結合されており、そして第2標識成分(D1)は第1ブロープの3'末端に共有結合されている。同様に、別の第1標識成分(A2)が第2ブロープ(P2)の5'末端に共有結合されており、そして別の第2標識成分(D2)が第2ブロープの3'末端に共有結合されている。相対するブロープの第1および第2標識成分(A1とD2)および(A2とD1)は第1および第2ブロープが相互に結合した第1の位置にあるとき相互作用することができ、

当分野で通常の知識を有する者は、標識成分が

第2波長( $h\nu_1$ )でエネルギーを発信もしくは転移し得る蛍光団(D1およびD2)である。相対するブロープの第1および第2蛍光団(A1とD2)および(A2とD1)は、第1および第2ブロープが相互に結合した第1の位置にあるとき相互作用することができ、こうして第2蛍光団から放射される光は消去される。さらに、通常第1蛍光団(A1およびA2)が変換できない波長 $h\nu_2$ の光は相互作用により波長 $h\nu_1$ の発光をもたらす。

第1図に示すように、ブロープ(P1およびP2)は標識鎖(T1およびT2)に加えるかまたは組み合わされる。ブロープおよび標識鎖は変性して分離させる。次に、ブロープと標識をハイブリダイズさせ、さらにブロープが標識と結合してブロープ-標識のハイブリッド(PT1およびPT2)を形成する第2位置へ結合させる。各ブロープ鎖の標識成分は相対するブロープ鎖の標識成分から分離されて相互作用することができない。

ブロープ鎖(P1およびP2)が相互に結合した第1の位置では、第2蛍光団(D1およびD2)

共有結合以外の方法、例えば限定するものではないが挿入(intercalation)、キレート化、およびイオンの、親水のまたは親水の親和性によりDNAブロープと結合または会合しうることを認めるであろう。本明細書で使用する“会合”という用語は標識成分をブロープに結合させる全ての手段を包含する。

本発明の標識成分はそれらを相互作用させる方法で対合または集合される。例えば、限定するものではないが、標識群は第1および第2蛍光団を含む標識成分の組合せ、蛍光団および化学発光成分の組合せ、化学発光成分および補助因子の組合せ、改変剤および可感化剤の組合せ、酵素および基質の組合せ、ならびに比色定量成分および補助因子の組合せであり得る。

第1図において、第1標識成分は特定波長( $h\nu_1$ )のエネルギーまたは光を受信し且つ第2波長( $h\nu_2$ )でエネルギーまたは光を発信し得る蛍光団(A1およびA2)である。同様に、第2標識成分は特定波長( $h\nu_3$ )のエネルギーまたは光を受信し且つ

を励起するのに適した波長( $h\nu_3$ )の光エネルギーの放射が、初期励起波長( $h\nu_3$ )または第2蛍光団(D1およびD2)の通常の放出波長( $h\nu_1$ )とは異なる波長( $h\nu_2$ )の光エネルギーを第1蛍光団(A1およびA2)から放出させる。ブロープ(P1およびP2)と標識(T1およびT2)との第2位置へのハイブリダイゼーションは、相対するブロープ鎖(A1とD2; およびA2とD1)の標識成分間士の相互作用の分裂をもたらす、そして第1蛍光団(A1およびA2)の放出波長( $h\nu_1$ )での光の放出を減少させる。第1標識成分、すなわち蛍光団(A1およびA2)、の放出波長( $h\nu_2$ )の光の放出減少は存在する標識の濃度と逆の関係にある。

第2蛍光団(D1およびD2)の発光は通常第1蛍光団(A1およびA2)の存在下で消滅され、その結果放出波長( $h\nu_1$ )の光エネルギーはほとんど放出されないか又は全く放出されない。しかしながら、ブロープ鎖(P1およびP2)と標識鎖(T1およびT2)がハイブリダイズしてブロー



ブー標的ハイブリッド(PT1およびPT2)を形成すると、相対するブローブ鎖(A1とD2;およびA2とD1)の標識成分同士の間相互作用がこわされて、第2蛍光団(D1およびD2)から放射( $h\nu_1$ )の検出可能な光エネルギーが放出され、これは標的(T1およびT2)と結合した第2位置をとるブローブ(P1およびP2)に特長的である。第2標識成分、すなわち蛍光団(D1およびD2)、の放出波長( $h\nu_1$ )の光の放出増加は標的鎖の濃度と関係がある。

2つの波長( $h\nu_1$ )および( $h\nu_2$ )での第1および第2標識成分、すなわち蛍光団(A1とA2;およびD1とD2)、の発光値は分析的に組み合わせられていずれか一方の値のみよりも優れた感度および精度の標的鎖の濃度に関する合計値を与えることができる。どちらの信号も標的鎖(T1およびT2)の存在について監視される。

第1および第2蛍光団の選択、光散乱、二次蛍光、および光を蛍光団に放射する励起装置または発光装置の制限により、多重信号をブローブ

およびD2)の信号発生能は、一般に検出するのが比較的簡単である。第2蛍光団(D1およびD2)の信号強度の増加は試料中の標的鎖の濃度および存在を示す尺度である。特定試料中の標的鎖の量が多くなればなるほど、第2蛍光団の放出波長( $h\nu_1$ )の信号強度は大きくなる。

本方法は第2図に示す装置を用いて実施される。この装置は次の主な手段:すなわち励起手段または光源、収納容器およびフォトンカウンタ(PD)の形の信号検出器を含む。

収納容器は標的ポリヌクレオチドを含む可能性がある試料と試薬を収容するのに適している。必要ならば、試料は当分野で知られた適当な標的捕獲/放出技法により標的ポリヌクレオチド以外の全ての細胞成分を除くために処理される。試料中のタンパク質系物質を溶解するためにはカトリオピック度が使用される。

試料は第1ブローブおよび第2ブローブを含む試薬と混合される。第1および第2ブローブはこれらのブローブが互いに結合する第1の位置、お

(P1およびP2)が互いに結合した位置にあるときの第1蛍光団(A1およびA2)の信号を検出することは難しいかも知れない。さらに、光放出波長( $h\nu_2$ )は第2蛍光団(D1およびD2)の相互作用により必ずしも第1蛍光団(A1およびA2)の通常の放出波長ではない。光放出( $h\nu_2$ )は第1蛍光団(A1およびA2)または第2蛍光団(D1およびD2)単独とは全く異なる組合せもしくはは群としての標識成分に特長的であり、あるいは消光されるかも知れない。

実性および再アニーリング後に、相対するブローブの標識成分、すなわち第1および第2蛍光団(AおよびD)は分離され、そして標的ブローブハイブリッド(PT1およびPT2)の形成により離れた状態にある。標的ブローブハイブリッド(PT1およびPT2)の形成は、第1標識成分の蛍光団(A1およびA2)が第2蛍光団(D1およびD2)からのエネルギーを受け入れる又は消す能力を促進する。エネルギーを受け入れる第1蛍光団へエネルギーを送る第2蛍光団(D1およびこれらのブローブの少なくとも一方が標的と結合しうる第2の位置をとることができる。各ブローブはそれと結合した第1および第2標識成分(例えば蛍光団)を含み、第1および第2標識成分はブローブが互いに結合した第1位置にあるとき相互作用する。試薬はハイブリダイゼーションを促進する当分野で知られた促進剤を含んでいてもよい。

自動分析用に設計された器具において、第2図に示す装置は好ましくは複数の収納容器を収めるための手段を含むであろう。試料を含む収納容器は順次分析される。試料の精製、加熱、混合および再アニーリングは標識信号が測定されるステーションから離れたステーションで行うのが好ましい。従つて、収納容器は試料の精製、加熱および混合を行う第1ステーションまたは一連のステーションから、ブローブおよび標的(存在するならば)を再アニーリングさせる第2ステーションへ運ばれる。その後、収納容器は検出信号を監視する第3ステーションへ送られる。

運搬手段は回転可能なターンテーブル、コンベヤーベルトまたは他の手段を含む。病院の臨床設定においては、運搬手段は手動による移動を含む。従つて、病院の医員は患者から組織試料を採取し、その試料を収納容器の中に入れることができる。試料の精製、加熱および試薬の混合はベッドサイドで開始され、そして収納容器を信号監視用の第3ステーションに移しながら継続されるだろう。

今や第1ステーションを参照すると、試料とプローブを融解温度に加熱するための加熱手段が収納容器にきわめて接近して配置されている。標的およびプローブはプローブ同士が互いに結合する第1の位置、または標的が存在する場合に少なくとも1つのプローブがその後の冷却の際に標的と結合する第2の位置のいずれかをとることができる。加熱手段は化学加熱、電気加熱または当分野で知られた他の加熱を含めた多くの形をとることができる。収納容器は試料とプローブの混合を促すために攪拌手段を含む。

第1ステーションから、プローブと標的(もし

存在するならば)を再アニーリングさせる第2ステーションへ収納容器を運ぶ。融解または変性温度からの収納容器の冷却を促進するために、第2ステーションは冷却手段を含む。冷却手段はもしも十分な時間が許されるならば必要でなく、プローブと標的を再アニーリングさせるためには周囲温度でも十分に低い。

第2ステーションを去つて、収納容器は信号(2つの位置の一方をとるプローブに特徴的である)を監視する第3ステーションへ送られる。

第3ステーションは標識成分の1つを励起する手段を含む。第1および第2標識成分が蛍光団であるこの例では、励起手段は第2蛍光団の実際の励起を生じさせないように適当なフィルターを備えた光源を含む。また、適当に狭い発光スペクトルをもつレーザーも使用し得る。

標識成分の1つが化学発光剤を含む場合、その励起手段は発光反応を生じさせるための適当な補助因子を収納容器の中に注入する手段を含むであろう。

第3の作業ステーションは収納容器からの蛍光を受けるべく配置された信号検出器、フotonカウンタ(P0)を含む。好ましくは2つのフotonカウンタ(PC)を使用する。1つのフotonカウンタは第1標識成分から発せられる信号を受信し、そして第2のフotonカウンタはフィルターまたは時間分解法の使用により第2標識成分から発せられる信号を受信する。

フotonカウンタはアナライザーによつて受信され、増幅され、処理されるフoton信号を発する。アナライザーはその結果をオペレーターに送る他の装置に表示させるように、フoton信号を処理して図式的に示すことができる値に変える。本装置はパルス化光源またはシノノイド変調光源と共にアナログデフエクターを使用することにより、寿命分解法に適合させることができる。寿命分解法は本発明者の係属中の米国特許出願第738560号(1985年5月28日付)に説明されており、これは参照によりここに引用される。

本発明は合成オリゴヌクレオチドと共に使用するのにも都合がよい。しかしながら、本発明は経絡的な方法でプローブ(P1およびP2)を製する生物学的クローニング法に容易に適合させることができる。

今や第3図を参照すると、標的配列に相補的であることが知られている塩基配列を含むDNAの二本鎖セグメント(以後プローブセグメントと呼ぶ)が慣用組換えDNA法によりプラスミドの中に挿入される。例えば、プラスミドはプラスミド環を調整して一本鎖の突出部または接合末端を生じさせる制限エンドヌクレアーゼで消化する。その接合末端はプローブセグメントの接合末端に相補的であつて、それと結合する。プローブセグメントはその後のクローニングの同定のための選択マーカーと共に挿入される。

プラスミドはその後のプラスミドが複製または増幅される大腸菌(*Escherichia coli*)のような細菌の中に挿入される。細菌はプローブセグメントと選択マーカーを首尾よく組み込んだ細胞以外

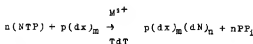
の細菌に対して有導である培地上でコロニーへと増殖させる。

細菌コロニーを増殖させてプラスミドを高コピー数へと複製させた後、細菌 DNA およびプラスミド DNA は他の細胞成分から分離し、その DNA を制限酵素で消化してプラスミド DNA からプローブセグメントを切断する。次いで、プローブセグメントは電気泳動を含めた適当な手段で分離する。そのプローブセグメントは末端修飾化してプローブを作製するのに適しているか、あるいはプローブとして価値があるサブセクションから成っている。従って、大きいプローブセグメントは制限酵素による消化を数回行つて、大きいプローブセグメントを小さいプローブサブセグメント（その 3' - および 5' - 末端を修飾化するのに適している）に切断しうる。

プローブセグメントまたはサブセグメントの 3' 末端の修飾化は、活性化蛍光団との反応に利用し得る官能基をもつヌクレオチドの使用により達成される。官能基をもつヌクレオチドはターミナル

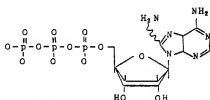
デオキシリボース リボチシルトランスフェラーゼ (TdT) の使用によりプローブセグメントに付加される。酵素 TdT はリボヌクレオチドの 1 個または 2 個の塩基をプローブセグメントに付加させるだけであり、従ってプローブセグメントへのヌクレオチドの尾部または伸長鎖の付加が回避されるだろう。ヌクレオチドの大きい尾部または伸長鎖は、標識成分間のエネルギー転移を変え、またプローブ鎖の標的鎖へのハイブリダイゼーションを定更もしくは損なり恐れのある立体効果を有するだろう。プローブセグメントの 5' 末端の修飾化は、二官能性脂肪族基を使用してプローブセグメントに標識成分を結合させることにより達成される。好ましくは標識成分は脂肪族シアミンによつてプローブセグメントに結合される。

初めに一本鎖 DNA の 3' 末端の修飾化について見ると、酵素 TdT の使用によりヌクレオチドを DNA 鎖に付加させる反応は次のように表わされる。



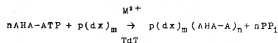
上記反応式において、 $p(dx)_m$  は長さ  $m$  個の塩基のオリゴデオキシヌクレオチドであり、 $N$  はアデニン、グアニン、シチジン、ウリジン、チミンまたはその誘導体のうちの 1 つである。 $n$  は DNA 鎖に付加される単量体の数を表わす。

好ましくは単量体は核糖のアミノアルキル誘導体を含むだろう。アミノ基は多数の蛍光剤と反応することができる。より好ましくは、アミノアルキル誘導体は第一脂肪族アミノ基を含む。酵素 TdT およびリボヌクレオチド単量体の使用は、DNA 鎖への単量体塩基の付加を 1 個または 2 個の塩基に制限する。 $M^{2+}$  は金属イオン補助因子を表わす。好適なリボヌクレオチド誘導体の例は 8 - (6 - アミノノヘキシル) - アミノアデニン - 5' - 三リン酸 (AHA - ATP) であり、その構造を以下に示す。



化合物 AHA - ATP は多様な種の蛍光標識の付加を可能にする種々の化学反応を受けることができる第一脂肪族アミノ基を含有する。

従つて、DNA 鎖の 3' 末端は AHA - ATP およびターミナルトランスフェラーゼと pH 7 において反応し、その反応は次のように表わされる。



得られる生成物鎖は改変剤または可溶化剤、比色定量化、発光剤、酵素または補助因子のような標識成分と反応し得るアミノ官能基を含み、それにより標識成分をもつプローブを製造することができる。例えば、蛍光団イソオシアネートは

pH 9.3 で AHA - ATP のアミン官能基と反応してプローブ鎖を形成する。その他のアミン反応性蛍光団には例えばフルオレセインイソチオシアネート、スルホローダミン 101 スルホン酸クロリド (テキサスレッド)、N-ヒドロキスチンイミジルビレンブタノエート、エオシンイソチオシアネートおよびエリトロシンイソチオシアネートが含まれるが、これらに限定されない。適当な化学発光剤および補助因子にはアミン反応性ルミノール誘導体、ミクロベルオキシダーゼ、アクリジニウムエステル、ペルオキシダーゼおよびそれらの誘導体が含まれる。当分野で通常の知識を有する者は、アミン反応性でない蛍光剤および化学発光剤をアミン反応性へと修飾して、本発明の標識成分として適するものに行うことができることを認めるであろう。

DNA 鎖はまたそれらの 3' 末端に 1-N<sup>o</sup>-エチノアデノシン-5'-三リン酸 (EATP) のような蛍光ヌクレオチド誘導体をターミナルトランスフェラーゼ (TdT) の媒介により付加して標識

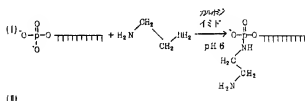
合成ポリヌクレオチドは 5'-ヒドロキシル基をリン酸化するための追加工程を必要とするだろう。リン酸化は工程(I)に先立つて酵素 T<sub>4</sub> キナーゼを用いて行われる。

好ましくは、カルボジイミドは水溶性であり、例えば 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)-カルボジイミド、ト- p-トルエン-スルホエートおよびそれらの誘導体を含む。

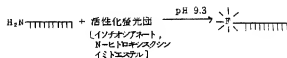
エチレンジアミンポリヌクレオチド誘導体は標識成分と反応することができる (工程 I) 反応性アミン官能基を有する。反応性アミン官能基は pH 9.3 でイソチオシアネートと反応してプローブ鎖を形成するだろう。一方の末端鎖 (例えば 5' 末端鎖) のための適当な標識成分は、他方の末端鎖 (3' 末端鎖) 成分を補足するように選択される。適当な蛍光団には例えばフルオレセインイソチオシアネート、スルホローダミン 101 スルホン酸クロリド (テキサスレッド)、N-ヒド

化することができる。しかしながら DNA へのデオキシヌクレオチドの付加は単純化するのが困難であり且つ立体効果を生じやすい多くの付加を含む屈曲または伸長鎖をもたらすかも知れない。他の蛍光ヌクレオチド誘導体には例えば 3'-(ジメチルアミノナフトイル)-ATP または -CTP および/または蛍光性複素環を含むヌクレオチド三リン酸が含まれる。

一本鎖 DNA の 5' 末端はその DNA 鎖の 5'-リン酸を活性化蛍光団に結合させるエチレンジアミンを使用することによる 2 段階反応で標識化され、この反応は次のように表わされる。



(I)



ロキスチンイミジルビレンブタノエート、エオシンイソチオシアネート、エリトロシンイソチオシアネートおよびそれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない。適当な化学発光剤および補助因子にはルミノール、ミクロベルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アクリジニウムエステル、ルシグニンおよびそれらの誘導体が含まれる。

今や第 4 図を参照すると、一本鎖 DNA に関して説明された標識法は、生物学的源から単離された二本鎖 DNA セグメントにも応用できる。こうして、図示するように、細菌プラスミドから単離された代表的 DNA セグメントは 2 本の相補的な DNA 鎖 (各 DNA 鎖は 3' ヒドロキシル基と 5'-リン酸基を有する) から成る。二本鎖 DNA セグメントはエチレンジアミンおよび活性化蛍光団と反応させて、両方の DNA 鎖の 5'-リン酸位置に第 1 蛍光団(A)を同時に共有結合させることができる。

次に、二本鎖 DNA セグメントは TdT の媒介

により  $AdA - ATP$  と反応させ、そして各 DNA 鎖の 3' - 位置に第 2 蛍光団 (II) を共有結合させる。従つて、一方のプロープ鎖の第 1 蛍光団 (I) は DNA セグメントの両末端で他方のプロープ鎖の第 2 蛍光団 (II) と相互作用するように位置づけられる。標識成分の第 1 蛍光団 (I) および第 2 蛍光団 (II) は相互作用して、プロープが環状のハイブリダイゼーションの際に与りうる 2 つの位置の一方に特徴的な信号を発することができる。

本発明は好適な実施態様の特徴を示す次の実施例によりさらに説明される。

#### 実施例

##### A. 物質および方法

次の実施例において、1 -  $H^+$  - エチノアデノシン - 5' - 三リン酸 (ナトリウム塩)、2' - デオキシアデノシン - 5' - 三リン酸 (ナトリウム塩)、DNA オリゴマー、およびセルロースに固定されたオリゴマーはニュージャージー州ビスカタウエーのファーマシア・バイオケミカルズ社から購入した。制限酵素はメリーランド州ガイサー

レイトール、0.016 M 塩化マグネシウムを含む。融合緩衝液は pH 7.5 で 1 M 塩化ナトリウム、0.02 M リン酸カリウム、一塩基性 ( $KH_2PO_4$ ) を含む。ホウ酸緩衝液は 0.05 M ホウ酸を含むか、あるいは塩酸または水酸化ナトリウムの添加により pH 9.3 に調整した 0.05 M ホウ酸ナトリウム溶液を含む。蛍光測定は DNA プロープの組成、DNA および DNA プロープの濃度、ならびに DNA 融解実験 (融解曲線) における塩基割合を測定するために行われた。蛍光スペクトルはキャリー 17 D 吸光度分光光度計 (カリフォルニア州パロアルタのバリアンアソシエーツ社) を使って記録した。温度の調製として DNA の蛍光の変化を測定するために、サーモスタット付きのキューベトホルダーの温度をハークモデル A 81 冷却水浴 (ニュージャージー州、サドル・ブロッグ) を用いて制御した。ホモポリマー濃度の測定において使用した蛍光係数は、ファーマシア・モレキュラー・バイオロジカルズのカタログの付録に載っている蛍光係数集録物から得た。同じ付録に載つて

スバーダのベセスダリサーチ研究所から購入した。低分子量形のターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ (TdT) はフロリダ州セントピータースバーダのライフサイエンス社から購入した。8 - (6 - アミノヘキシル) - アミノアデノシン - 5' - 三リン酸 ( $AdA - ATP$ ) はミズーリ州セントルイスのシグマケミカルズ社から購入した。プラスミド pSP 6.5 はウィスコンシン州マジソンのプロメガ・バイオテックから購入した。アミン反応性蛍光団はオレゴン州ジャンタコンシティのモレキュラー・プローブズ社から購入した。他の全ての試薬は分析級またはそれ以上のものであつた。合成 DNA オリゴマーはいくつかの市販源 (カリフォルニア州エメリービルのアメリカン・バイオスクレーアを含む) からの試験品および標準ホスホルアマダイト法を用いてバイオサーチ・サム・ワン自給 DNA 合成機 (カリフォルニア州サンアラファエル) で製造した。

本実施例において、TdT 反応緩衝液 (2 X) は pH 7.1 で 0.4 M カロジル酸、0.002 M ジチオト

いるホモポリマーおよび交互ホモポリマー DNA の蛍光係数の平均は混合塩基配列の蛍光係数を計算するために使用され、一本鎖 DNA については  $8.7 \times 10^4$  l / mol / 塩基 および二本鎖 DNA については  $6.8 \times 10^4$  l / mol / 塩基 であつた。非結合蛍光団の蛍光係数は複合 DNA プロープ中に存在する蛍光団の量を測定するために使用した。

蛍光スペクトルは SLM モデル 4800 アナログ分光光度計 (イリノイ州アーバナ、SLM - AMINCO インストルメンツ社) を使って測定および記録した。より優れた感度を得るために、アナログ分光光度計は蛍光のフロン計数検出を行うように改良した。この改良は通常の検出器の代わりに、周波数域ハウジング内にハマツモデル R 928 光電増倍管を、そして -30 V 付近に保たれた熱電冷却ハウジング (リサーチモデル TE - 177 RF 用の製品) 内に同じ量の光電増倍管を含んでいた。管のアノードの電流パルスが増幅され、調整され、そして 80 & 0 ORTEC スケラレー・インストルメンテーション・モジュールを使って計測

された。このモジュールはモデル9301フースト前置増幅器、モデル9302増幅器・弁別器、およびモデル874ワードカウンタ/タイマーを含んでいた。光電増幅管のダイノード・チェーン (Dynode chain) のための高電圧はE0 & G ORTBC モデル478電圧供給器によって供給した。

カウンタモジュールはヒューレット・パッカード9825コンピュータにIEEE-488インタフェースを介して接続した。コンピュータおよびインタフェースは蛍光光計の非収束部分の基準検出器判定およびモノクロメータ燈亮と同調させてフォトン計測スペクトルを得られるようにした。

温度制御はハートモデルA81水浴と接続したGLMサーモスタット付きキュベットホルダーを用いて維持した。

発光しない場合、試料の発光は一般にモノクロメータの代わりにフィルターを使用した蛍光光計の第2開口部を通して測定された。フルオレ

セイン標識DNAを含む試料からの発光は、520 nm (FWHM = 8.2 nm) に集中したピーク透過率をもつデイトリシク・オプティクス3キャビティ干渉フィルターを通して偏光した。フルオレセイン試料は2 nmに設定されたモノクロメータ帯域幅で490 nmにおいて励起された。時間の関数としてのフルオレセイン発光は、データ蓄積および運動学的情報の処理が可能なヒューレット・パッカードモデル9836コンピュータにインタフェースで接続されたカウンタモジュールによって記録した。

いろいろな公知のハイブリダイゼーション条件が本方法において使用された。ハイブリダイゼーション条件のための一般基準はメインコス (Meinkoth) およびワール (Wahl), Analytical Biochemistry, vol. 138, p. 267-284 (1984) に開示されている。

当分野で通常の知識を有する者は必要に応じて次の条件を使用するであろう。ハイブリダイゼーションの最適速度は一般に融解転写温度より約

20°〜25℃低い温度で得られる。より高いストリンジエンシー (Stringency) のためには、ハイブリダイゼーションは融解温度の5°または10℃以内の温度で行われる。ラムダDNAの形のキャリアーDNAの添加は、低濃度でプローブの安定性を高めることが明した。いくつかの場合には、DNAの安定性を改善するためにEDTAも加えられた。融解剤や促進剤のような他の添加剤は、これらがプローブの作製に使用されるサイズオリゴマー (size oligomer) に効果的であり且つこれらの添加によって蛍光バックグラウンドが非常に増加しない限り、ハイブリダイゼーション溶液中で使うことができる。

実験で使用する一般方法は、まず最初に標的とプローブDNAを一本鎖の形にする第1工程を含む。これは標的および試料DNAを含む試料を水中で加熱することにより達成された。長いDNA標的の場合は、一般に試料は沸騰水中で低塩緩衝液 (または蒸留水) 中約10分間加熱される。プローブは高温への長期暴露を避けるために、

しばしばデハイブリダイゼーション法の終了付近で標的DNA含有試料に加えられた。デハイブリダイゼーションの最後に、ハイブリダイゼーションのための塩および緩衝剤の所望濃度を達成すべく、濃厚緩衝液を加えた。比較的小さいオリゴマー標的およびプローブは、より低い温度においてより高い塩緩衝液中で融解 (変性) される。通常のハイブリダイゼーションでは1MのNaClが使用されるが、DNAの融解温度を下げたい場合は100mMのNaClも使用できる。その後、標的およびプローブの両方を含む一本鎖試料はハイブリダイゼーション温度まで冷却させ、そして蛍光増強の相互作用の強度を確かめるために蛍光測定を行った。ハイブリダイゼーション時間の決まりは数分 (高プローブ濃度の試料の場合) から数時間 (低濃度のプローブDNAを含む試料の場合) まで変化した。

次の実施例は代表的な実験方法を説明するものであり、初めにプローブセグメントの3'末端標識化を示し、次にプローブセグメントの5'末端標識

化を示し、そして最後に末端標識生成物の融合的反応換定法への応用について示す。

### II. 3' - 末端塩基化

一本鎖 DNA の 3' 末端は 2 工程反応で標識化した。第 1 工程では、反応性官能基をもつ 1 個のヌクレオチドを各 DNA 鎖の 3' ヒドロキシル基に結合させるために、酵素 TdT を使用した。第 2 工程は反応性官能基との反応によつて標識成分を各 DNA 鎖に結合させることを包含していた。

次の方法は 1 2 塩基長のデオキシチミジン (dT<sub>12</sub>) の一本鎖ホモポリマー、それぞれ 20 塩基長のポリデオキシアデノシンおよびポリデオキシチミジンの二本鎖ホモポリマー (dA<sub>20</sub>-dT<sub>20</sub>)、混合塩基台成オリゴマー、および酵素 AluI および Hae III で消化されたネオマイシンホスホトランスフェラーゼ伝子フラグメントを含む pSP65 のプラスミドフラグメントを使用して行った。

今や第 1 工程をさらに詳しく見てみると、標準円錐形プラスチック管の中で約 10 nmol の DNA を 3.3 mM AHA - ATP 水溶液 (2.55 μM と混合

し、その試料を速心真空装置 (Speed Vac, サバント) で乾燥させた。DNA / AHA - ATP 溶液中の AHA - ATP 分子 : DNA の 3' 末端ヒドロキシル基の比は約 10 : 1 であった。DNA / AHA - ATP 溶液に、TdT 反応緩衝液 30 μL、ウシ血清アルブミン 20 μL (水 1 μL 当たりウシ血清アルブミン 500 μg)、TdT 500 単位、および水を加えて 70 μL の反応混合物を得た。この反応混合物を 37 °C の水浴中で 18 ~ 24 時間インキュベートさせた。

セルロース粒子に固定した相補的ホモポリマーに上記ホモポリマーを 10 °C で結合させ、続いて結合緩衝液を用いてそのセルロースを 20 °C で洗浄することにより、標 A のホモポリマー鎖を未反応の AHA - ATP から分離した。次に、生成物を溶解して、pH 9.3 の 0.05 M ホウ酸緩衝液中にセルロース粒子から分離した。

ホモポリマー二本鎖、混合塩基オリゴマー、および pSP65 二本鎖プラスミド制限フラグメントはセファデックス G-25 クロマトグラフィー媒

質および水またはホウ酸緩衝液中の溶解を使用するゲル透過クロマトグラフィー、あるいはバイオラッド研究所で製造した NACB イオン交換カラムのようなイオン交換カラムにより未反応の AHA - ATP から分離した。

第 2 工程では、一本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、二本鎖ホモポリマー、または二本鎖プラスミドフラグメントを一まとめにして考えると、AHA - ATP と各 DNA 鎖の 3' 末端との反応により形成された末端アミノヘキシルアミノアデノシンの第一脂肪族ノ基に、アミン反応性蛍光団が共有結合された。アミン反応性蛍光団にはスルホローダミン 101 (テキサスレッド)、ビレンブタノエート、フルオレsein、エオシンおよびエリトリン、インテオシアネート誘導体、スルホン酸クロリド、および N-ヒドロキシタシンイミドエステルが含まれる。アミン反応性蛍光団は適当な非反応性可溶性溶剤に溶解され、N-ヒドロキシタシンイミジルビレンブタノエートはアセトンに、スルホローダミン 101 スルホ

ン酸クロリドはジメチルホルムアミドに、そしてフルオレseinインテオシアネートはジメチルスルホキシドにそれぞれ溶解した。0.01 モルの蛍光団溶液を、AHA - AMP 結合 DNA 鎖を含む 0.05 モルのホウ酸/水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 9.3) に飽えず攪拌しながら滴下した。

AHA - AMP 結合 DNA 鎖に対して 20 倍 ~ 200 倍モル過剰の反応性蛍光団を使用して、この反応を目的生成物へと至らしめた。反応は 16 ~ 24 時間続けた。反応時間の終りに、蛍光団標識化一本鎖ホモポリマーをマフィニタクロマトグラフィーにより単離した。蛍光団標識化された二本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、およびプラスミド pSP65 の制限フラグメントは NACB カラムまたは上記のようなゲル透過クロマトグラフィーにより単離した。蛍光団標識化された一本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマー、二本鎖ホモポリマー、および二本鎖プラスミドフラグメントは水もしくは結合緩衝液中に単離した。長時間貯蔵のために、蛍光団標識化 DNA 溶液は速心真空装置

極端で真鍮乾固させ、-20℃で貯蔵した。

上記の2工程3'末端修飾法の例法として、ホリヌタレオチドは酵素TdTを用いて蛍光ヌタレオチドにより直接標識化することができる。例えば、一本鎖ホモポリマー類はAHA-ATPを一本鎖DNAの3'末端に付加する方法と同じ方法を用いて、その3'末端が蛍光団、1, N<sup>6</sup>-エチノアデノシン三リン酸(εATP)、修飾ヌタレオチドで標識化された。

上記方法は図1に示すように一本鎖および二本鎖オリゴマーの3'末端に位置づけられた蛍光標識成分をもたらした。

#### 0. 5'-末端標識化

DNAの一本鎖ホモポリマー、DNAの二本鎖ホモポリマー、およびプラスミドDNAの制限フラグメントの5'末端は2工程反応で標識化した。第1工程では、DNA鎖の末端5'リン酸基と反応性の二官能性有機分子(5'リン酸基を標識成分に結合しうる)とをチュー(B. C. F. Chu)、ワール(G. M. Wahl)およびオーゲル(L. Orgel), Nucleic Acids Research, 11(18); 6513-6529(1983)に記載の方法に従って結合させた。第2工程はDNA鎖/反応性有機分子を標識成分と反応させてプローブ鎖を形成させることを包含する。

当分野で習熟した者は、多くの形の天然に存在するDNAがその5'末端でリン酸化されることを認めるであろう。非リン酸化DNAは酵素T<sub>4</sub>キナーゼを用いる初期リン酸化工程を必要とし、この方法は当分野でよく知られている。5'-DNA末端標識システムについてのベセスダ・リサーチ研究所の製品カタログを参照されたい(ここに参照

表1 3'末端標識化DNAオリゴマー

オリゴマー	標識用化合物	オリゴマー当たりの標識
dT <sub>12</sub>	フルオレセインイソチオシアネート	0.88
dT <sub>12</sub>	フルオレセインイソチオシアネート	0.72
dT <sub>12</sub>	1, N <sup>6</sup> -エチノアデノシン	0.95
dT <sub>12</sub>	1, N <sup>6</sup> -エチノアデノシン	1.0
dT <sub>12</sub>	スルホロダミン101スルホンクロリド(チキサスレド)	1.1
dT <sub>12</sub>	スルホロダミン101スルホンクロリド(チキサスレド)	0.98
dT <sub>12</sub>	N-ヒドロキスチグジニミジルピレンブタノエート	0.82
dT <sub>12</sub>	N-ヒドロキスチグジニミジルピレンブタノエート	0.85
dT <sub>12</sub>	エトキシイソチオシアネート	1.1
dT <sub>12</sub>	エトキシイソチオシアネート	2.6
dT <sub>20</sub>	N-ヒドロキスチグジニミジルピレンブタノエート	0.59
dT <sub>20</sub>	エトキシイソチオシアネート	1.9

により引用される)。

例えば、第1工程を詳細に説明すると、水溶性カルボジイミドの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドを用いて、エチレンジアミンと、一本鎖DNA、二本鎖ホモポリマーおよびpSP65プラスミドの二本鎖制限フラグメントの末端5'リン酸基とを結合させた。反応混合物は50nmolのDNAを500μlの水に溶解し、0.5Mエチレンジアミン、0.2Mカルボジイミドおよび0.2M2-(N-モルホリノ)-エタンスルホン酸を含有する500μlの反応溶液(pH6.0に調整)と混合することにより調整した。この反応混合物を室温で16〜24時間攪拌した。

エチレンジアミンと反応したDNAの一本鎖ホモポリマーは、反応混合物に塩化ナトリウムを1モル濃度になるまで加え、次にその混合物をセルロースに固定した相補的ホモポリマーを含むカラムに10℃で過すことにより精製した。その後カラムは相合緩衝液を用いて10℃で、次に20℃



で洗浄した。エチレンジアミンと反応した DNA ホモポリマーは 50～65℃の温度でそのカラムに 0.05 M ホウ酸緩衝液を通すことにより回収した。

二本鎖ホモポリマー、混合塩基オリゴマーおよびプラスミド DNA の制限フラグメントは、エチレンジアミンと反応した DNA をセファデックス G-25 カラムに通し、ホウ酸/水酸化ナトリウム緩衝液で溶離することにより精製した。別の精製法は低塩緩衝液中でエチレンジアミン反応 DNA をパイオラッド NAC8 カラムに結合させ、高塩緩衝液または 2.0 M 酢酸アンモニウムで溶離することを含む。2.0 M 酢酸アンモニウムで溶離した試料は、速心真空装置または凍結乾燥機を用いて塩緩衝液を除去すべく乾燥させた。

第 2 工程では、反応性有機成分のエチレンジアミンと結合した DNA 鎖を反応性蛍光団とさらに反応させてプローブ鎖を製造した。より詳細には、アミン反応性蛍光団（イソトシアシアネート誘導体または N-ヒドロキシスチンイミドエステル）を適当な非反応性可溶性溶剤に溶解した。エチレ

ンジアミン反応 DNA を含む 0.05 M ホウ酸緩衝液に pH 9.3 で飽和し溶解しながら 0.01 M 塩基緩衝液を調下した。反応性蛍光団はこの反応を目的の生成物へと至らせるために 20 倍～200 倍モル過剰に加えた。反応は溶液中に 16～24 時間継続した。

反応時間の終りに、5'-蛍光団標識化 DNA を精製した。5'-蛍光団標識化ホモポリマー一本鎖 DNA はアフィニティクロマトグラフィーにより単離した。5'-蛍光団標識化された二本鎖 DNA、混合塩基オリゴマー、または標識プラスミド制限フラグメントは NAC8 カラムもしくはゲル透過クロマトグラフィーにより単離した。5'-蛍光団標識化二本鎖ホモポリマーまたはプラスミド制限フラグメントはその後水もしくは結合緩衝液中に単離した。5'-蛍光団標識化一本鎖 DNA は下記の表 2 に示される。

表 2 5'-末端標識化 DNA オリゴマー

オリゴマー	標識用化合物	オリゴマー当たりの標識
dA <sub>12</sub>	フルオレセインイソシアネート	0.89
dA <sub>12</sub>	フルオレセインイソシアネート	0.96
dA <sub>12</sub>	N-ヒドロキシスチンイミド ビレンタノエート	0.70
dA <sub>20</sub>	フルオレセインイソシアネート	1.1
d(AC) <sub>5</sub>	フルオレセインイソシアネート	0.59
d(AC) <sub>5</sub>	フルオレセインイソシアネート	0.90

5' 末端標識化ホモポリマープローブ鎖は相補的な 3' 末端ホモポリマー鎖と結合して、二本鎖（一方の鎖の 3'-末端成分が他方の鎖の 5'-末端成分と相互作用する位置にある）を形成することができる。5'-および 3'-ホモポリマー二本鎖およびプラスミド制限フラグメントは、2 本の末端標識化相補的ポリヌクレオチドプローブ鎖を含む。

多数の二本鎖プローブまたは大腸菌エンテロキシン受容子の合成 DNA から作成することができる。

オリゴマーの相補対を合成して、その後標識した。大腸菌エンテロキシン/受容子のグノム上の 5 つの異なる領域に対応する塩基配列をもつ 5 対のオリゴマーを製造した。4 対は 21 塩基長のオリゴマーを含み、1 対は 22 塩基長のオリゴマーを含んでいた。10 の一本鎖オリゴマーは標識するために 2 群に分けた。1 群はそれぞれの相補対の一員を含み、他群は他の対員を含んでいた。ターミナルトランスフェラーゼ反応混合物中にハイブリダイズした DNA を選別するために、非相補鎖同士を 1 つの群に集めた。末端スクレオチドの酢酸付加は、平滑末端の二本鎖 DNA プライマーを使用する場合にあまり効率がよくない。この方法の標識効率は先の二本鎖プローブ製造のときに得られたものほど高くなかったが、ハイブリダイゼーションに関連する蛍光の変化は相対的に低いプローブ濃度でそれを検出するのに十分なほど大きかった。

二本鎖ホモポリマー、プラスミド制限フラグメントおよびトキシン受容子プローブは下記の表 3 に示される。

表 3  
二重末端修成化二本鎖

5'-修成化		3'-修成化		ハイブリッド 形に対する 非ハイブリッド 形の発光強度
二本鎖	修成化化合物	二本鎖当 たりの修成	二本鎖当 たりの修成	
$dA_{10} \cdot dT_{10}$	フルオレセイン イソチオシアネート	0.61	N-ヒドロキシスチレンイミ ジルビレンブタノエート	3.9
$dA_{20} \cdot dT_{10}$	フルオレセイン イソチオシアネート	1.2	エオジニソチオシアネート	2.6
* プラスミド I	フルオレセイン イソチオシアネート	3.2	N-ヒドロキシスチレンイミ ジルビレンブタノエート	4.1
* プラスミド II	フルオレセイン イソチオシアネート	1.3	N-ヒドロキシスチレンイ ミジルビレンブタノエート	4.0
* プラスミド III	N-ヒドロキシスチレンイミ ジルビレンブタノエート	1.7	フルオレセイン イソチオシアネート	0.91
** トキシン	フルオレセイン イソチオシアネート	(+)0.45 (-)0.49	N-ヒドロキシスチレンイミジ ルビレンブタノエート	(+)0.46 (-)0.60

\* A2U1 および Hae II 酵素で消化された、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子  
を含む pSP65 ( Wisconsin州マジソン、プロモバイオテック社 )。

\*\* 大腸菌エンテロキシン遺伝子に相補的な感受オリゴマー。

今や表3を参照すると、ホモポリマー二本鎖、  
混合塩基オリゴマー、およびプラスミド制限フラ  
グメントはそれぞれの各鎖の3'末端および5'末  
端の両方に修成を含む。表1、2および3は二本  
鎖当たりの修成または一本鎖当たりの修成を、修  
成化反応の効率の表示として含む。プローブ当  
たりの修成の数は蛍光分光分析法により測定した。  
相補的プローブ鎖の修成成分は、それらのプロ  
ーブが互いに結合した位置にあるとき、第5図に  
グラフで示すように相互作用することができる。  
第5図は温度がハイブリダイズしたプローブの融  
解温度に関して変化するときの温度に対する発光  
放出の関係を示している。プローブはそれぞれ  
12塩基長のデオキシアデノシンとデオキシチミ  
ジンのホモポリマー二本鎖であり、5'-フルオ  
レセインと3'-スルホローダミンの修成群を含む。  
図示するように、中央の円および三角形はプロ  
ーブ含有試料の温度が降下しつつあるときに得られ  
た値を表わす。中央の円および三角形はプロー  
ーブ含有試料の温度が上昇しつつあるときに得られた

値を示す。三角形によつて示された点は発光放出  
の温度消光についての補正値を表わす。円によつ  
て示された点は実験値を表わす。

より詳細には、第5図の融解曲線データは、1M  
NaCl および0.02Nリン酸カリウムからなる緩  
衝液(pH7.5)中のDNA試料について記録し  
たものである。第5図にプロットしたデータは導  
モル量(0.1μM)の5'-フルオレセイン-dA<sub>12</sub>  
およびdT<sub>12</sub>-スルホローダミン-3'を混合し、  
多くの試料温度での試料の平衡化の後に発光放出  
を測定することにより得た。また発光放出に対す  
る温度の影響を調べるために、5'-フルオレセイ  
ン-dA<sub>12</sub>単独の発光を同一温度で測定した。5'  
-フルオレセイン-dA<sub>12</sub>単独測定からのデータ  
は2種のプローブ試料について記録された融解曲  
線を補正するために使用した。補正データおよび  
未補正データの両方をプロットした。

プローブを冷却して再アニーリングするとき、  
発光放出が抑制されて発光信号強度の減少が生じ  
る。プローブを融解温度または変性温度に加熱す

るとき、プローブは分離して標識成分同士の相互作用がなくなる。蛍光放出はもはや抑制されず、蛍光放出が増大する。

第5図に示す標識成分の相互作用は、DNAハイブリダイゼーションを溶液中で測定するための慣用方法で測定した“非標識”プローブの融解温度データと一致する。第6図は温度が非標識プローブの融解温度により変化するときの温度と、260nmでの光エネルギーの吸光度と、の関係をグラフによつて示している。第6図に示すプローブは12塩基長のデオキシアデノシンおよびデオキシチミジンのホモポリマーを含む。中央の円で示したグラフの点は試料の温度が降下しつつあるときに読み取ったものである。中空の円は試料の温度が上昇しつつあるときに読み取ったものである。プローブの温度がプローブの融解温度により変化するにつれて、280nmでの吸光度は塩基対当たりの減少が原因で約0.135から約0.182まで増加した。吸光度測定によつて得られた非標識DNAの融解温度は、蛍光団の相互作用により制

定した標識DNAの融解温度と同じであり、このことはDNAの標識化がハイブリダイゼーション過程を妨害しないことを示している。

標識成分の相互作用はまた表3および表4に示される。表3は非ハイブリッド形に対するハイブリッド形の標識ホモポリマー複合体およびプラスミド制限フラグメントの蛍光強度の比較を含む。ハイブリダイズしたプローブの信号に対するハイブリダイズしなかつたプローブの信号の比は4.1程度に高いこともあり得る。

表4はハイブリダイズした標識プローブに対するハイブリダイズしなかつた標識プローブの蛍光強度の比較を示す。

表 4  
相補的一本鎖標識プローブにおける蛍光団の相互作用

5' 標識オリゴ	3' 標識オリゴ	オリゴマーの長さ(塩基数)	検出した標識	ハイブリッド形に対する非ハイブリッド形の蛍光強度
フルオレセイン	スルホローダミン	12	5'	5.4, 1.7
フルオレセイン	ビレンブタノエート	12	5'	6.2, 6.9, 6.0
ビレンブタノエート	フルオレセイン	12	3'	1.4
ビレンブタノエート	ビレンブタノエート	12	両方	1.5
フルオレセイン	フルオレセイン	12	両方	1.7
アクリジン	フルオレセイン	12	3'	1.2
アクリジン	スルホローダミン	12	3'	1.88
フルオレセイン	エチノアデノシン	12	5'	0.67
フルオレセイン	エオシン	12	5'	2.8, 1.35
フルオレセイン	エイトロシン	12	5'	1.8
フルオレセイン	エオシン	20	5'	5.9
フルオレセイン	ビレンブタノエート	20	5'	3.6

表 3 および表 4 において、蛍光の変化はハイブリダイゼーション条件下で観察された蛍光に対する非ハイブリッド状態の一方または両方の標識の蛍光の比として表わされる。データはハイブリダイゼーション状態を選択するために温度を使用した実験；相補的プローブを一様に、その後単独で試験した実験；またはプローブのハイブリダイゼーションを大過剰（通常 10 倍またはそれ以上）の非標識相補 DNA の存在または不在下で行った実験；のいずれから得られた。後者の実験において、大過剰の標識 DNA は相補的 DNA プローブ両方が互いにハイブリッドすることを妨げる競合的ハイブリダイゼーション反応をもたらす。同じ標識オリゴマーの異なる製法を試験したプローブ対については、蛍光変化の標識の値が記入されている。表 1 はオリゴマーの単一標識化によって作られたプローブを使って得られたデータを含む。これらのプローブの組成は表 1 および表 2 に載っている。表 3 のデータは第 1 蛍光団が各オリゴマーの 5' 末端にあり且つ第 2 蛍光団が 3' 末

端標識に従って行動しないいくつかの相互作用を示す。フォルスター型エネルギー転移機構と一致しない挙動を示す標識の組合せはフルオレsein/ビレンタノエートおよびフルオレsein/アクリジンである。

たといいくつかの標識組合せがフォルスター型エネルギー転移の典型的な行動を示すとしても、相互作用のメカニズムは 2 つの標識の一方だけから収集されたデータからは確認することができない。試験した標識組合せにおいて、標識対の他方の一員は DNA に結合したとき本質的に非蛍光性であるか、あるいはハイブリダイゼーションの状態にほとんど影響を受けない蛍光を示した。標識の相互作用の仕方の不確かさは、2 つの標識分子を互いの衝突距離内にたす能力の結果である。衝突による相互作用が可能である場合、動的蛍光のいろいろな標識が報告して、観察される相互作用を支配しうる。接近した細胞の動的相互作用はまた静的相互作用よりも頻度上顕著であると思われる。

端にあるように標識されたプローブから誘導される。ハイブリダイゼーション条件において、一方の標識の 5' 第 1 蛍光団が相補標識の 3' 第 2 蛍光団と組み合わせて変化する。

表 3 および表 4 は 2 つの標識の少なくとも 1 つの蛍光に有意な変化が生じる数種の標識の組合せを示す。フォルスター（Förster）型エネルギー転移機構では、比較的長い波長の光を吸収および放射する標識は、その標識の励起の速に他の標識（エネルギー供与体）からのエネルギーを受けとることが予期される。その標識が蛍光である場合、これはエネルギー受容標識からの蛍光の増加に伴って起こるエネルギー供与標識からの蛍光の減少をもたらす。この機構に適合しうる挙動を示す標識の組合せはフルオレsein/スルホローダミン 101、アクリジン/スルホローダミン 101、フルオレsein/エタノアデノシン、フルオレsein/エオシンおよびフルオレsein/エトリロンである。

しかしながら、表 3 および表 4 はフォルスター

表 3 および表 4 に示したいくつかの蛍光変化は、タンパク質分子（すなわち抗体および/またはタンパク質抗原）のランダム標識化を基にして両方または一方の標識物質を作らねばならない蛍光/エネルギー転位に基づきイムノアッセイにおいて観察されたものよりも大きい。従って、抗原：抗体複合体では標識のほんの少しの面分のみが互いとの静的または動的相互作用に与って選した位置にあるかも知れない。一方、DNA 末端の選択的標識化は相対する標識の正確な位置づけを可能にし、それ故にハイブリダイズしたプローブ類の全ての標識によつて衝突の相互作用が可能となり、また静的な相互作用が強められる。

表 3 および表 4 のデータはまた標識を DNA に結合させる方法を適切に選択することの必要性を指摘している。フルオレsein が 3' 末端にあり且つビレンタノエートが 5' 末端にある実験の場合、標識の相互作用がたとえあつたとしてもほとんど観察されず、一方フルオレsein が 5' 末端にあり且つビレンが 3' 末端にある場合は相当な相

相互作用が検出される。これは制限酵素で消化したプラスミド DNA ばかりでなくホモポリマーオリゴマーにも観察された。標識の配置の相違は 2 つの別々の末端に標識を結合させる際に使用した異なる化学に関係しており、3' - 標識はアミノヘキシルアミノアデノシンリンカーを介して結合されるが、5' - 標識はエチレンジアミンリンカーを介して結合された。

#### D. 結合の検定

本発明の試薬プローブは親合的 DNA 検定に応用した。このハイブリダイゼーション法は 5' - フルオレセイン- $dA_{12}$  および  $dT_{12}$  - スルホローダミン-3' ホモポリマーを含むプローブに特徴的である。

第 7 図を参照されたい。ここではプローブと標的 DNA の溶液が混合された。プローブの濃度は 0.1  $\mu M$  に定め、標的濃度はゼロから 0.5  $\mu M$  の間で変えた。プローブは標的 DNA、十分量の水および緩衝液 (pH 7.5 で 1.0 M 塩化ナトリウムおよび 0.01 ~ 0.02 M 塩基性リン酸カリウム

の最終濃度を与える) と混合してハイブリダイゼーション溶液を調製した。この溶液を水浴中 65  $^{\circ}C$  で 15 分間加熱して、標的とプローブ DNA の完全なデハイブリダイゼーションを行った。次に試料を 2 時間かけて 10  $^{\circ}C$  へと冷却させ、親合的ハイブリダイゼーションを起こさせた。

第 7 図はフルオレセイン/ソチオシアネート (フルオレセイン) で標識化したデオキシアデノシンホモポリマーおよびスルホローダミン/スルホン酸クロリド (スルホローダミン) で標識化したデオキシチミジンホモポリマー (各々 12 塩基対) からなる一定濃度の 10  $^{\circ}C$  本銀プローブを含むいろいろな濃度の標的 DNA についての、蛍光強度 (相対単位) 対塩基の関係をグラフにより示している。全ての試料は 300 nm の光エネルギーを照射した。

約 520 nm の波長でのピーク蛍光強度は、12 塩基対のデオキシアデノシンおよびデオキシチミジンの標的ホモポリマーの濃度変化により変化する。

第 8 図は標的濃度に対する蛍光放出の関係を示す。第 8 図のグラフの点は一定濃度のプローブを使用した第 7 図のグラフのピーク値である。標的濃度が増すにつれて、スルホローダミンによる蛍光強度が低下して蛍光放出が増大する。

5' - フルオレセイン- $dA_{12}$  /  $dT_{12}$  - ビレンブタノエート - 3' 系について先に示したハイブリダイゼーションデータは、相互作用する標識に基づいた親合的 DNA ハイブリダイゼーション検定の概念を説明する上で役に立つ。しかしながら、有用な検定系であるためには、この方法が特異的であり且つ感度が使われていることを示さねばならない。

第 9 ~ 12 図のデータは標識の相互作用に基づく検定法のこれらの面を立証するのに役立つ。標識の特異性は表 3 に示した最初の  $dA_{20}$  :  $dT_{20}$  誘導二本鎖プローブを使って第 9 図に示される。

この実験では、50 nM プローブ溶液といろいろな濃度の 3 つの異なる標的 DNA とを水中で混合した。1 つの標的は等モル量の  $dA_{20}$  および

$dT_{20}$  から成っており、これはプローブとのハイブリダイゼーションにふさわしい標的であつた。2 つの非相補標的はクサン胸腺 DNA とラムダファージ DNA であつた。試料は煮沸水浴中で 6 分間加熱し、その後室温まで冷却させた。次いで試料を 2 M 硫酸銅硫酸緩衝液で半分に希釈して、pH 7.5 ににおいてそれぞれ 100 mM と 10 mM の最終 NaCl およびリン酸カリウム濃度を得た。その直後に室温での蛍光スペクトルを各試料について記録した。

第 9 図にプロットした蛍光強度データは、正しい標的 DNA ( $dA_{20}$  :  $dT_{20}$ ) を使用した場合に、予測された濃度依存性の親合的ハイブリダイゼーション挙動を示す。標的 DNA 濃度は異なる分子量の標的を使用したので塩基対に換算してプロットした。各試料中に含まれる標識二本鎖プローブの対応する塩基対濃度は 1  $\mu M$  (50 nM 二本鎖プローブ) であつた。約 1.2  $\mu M$  の  $dA_{20}$  :  $dT_{20}$  (1  $\mu M$  の値に近い) のところで生じた蛍光変化の中間点は、相補標的鎖が相補プローブ鎖に対し

てもつと同じ親和性を互いに対して有する融合のハイブリダイゼーションを予期させた。非相補的標的 DNA (ウシ胸腺 DNA とラムダ DNA) を使つて集めたデータは、通常の非相補的 DNA が相補的プローブ鎖同志のハイブリダイゼーションを訪げなかつたので、プローブが  $dA_{10} : dT_{10}$  標的 DNA に対して特異的であることを示した。

ハイブリダイゼーション検定の感度は、比較的低いプローブ濃度で融合のハイブリダイゼーションを行うことにより証明した。500 pM、50 pM および 5 pM 濃度の標的  $dA_{10} : dT_{10}$  プローブを用いた融合のハイブリダイゼーションから得られたデータを第 10 図に示す。これらの実験では、プローブと標的 DNA とを pH 7.5 の 100 mM NaCl および 10 mM リン酸カリウムを含む緩衝液中で混合した。次いで試料を 80℃ で 10 分間加熱し、その後 5 度/時間の割合で 20℃ まで低下させた。これはコンピュータ制御水浴を使つて行つた。蛍光放出は 20℃ で各試料について測定した。標的濃度の関数としての蛍光放出強度

すデータから差し引かれる。

検定感度の増加を可能にする 1 つの方法は、対象とするゲノムの異なる領域とハイブリダイズする複数のプローブを使用することである。これに関する 2 つの手法が試験された第 1 の手法では、制限酵素の使用により天然 DNA から複数の二本鎖プローブを作製した。ネオマイシンホストプラスミドから近位子を pSP65 プラスミド (ウイコンシン州マジソン、プロメカ・バイオテック社) に挿入して、このプラスミドを大腸菌内で増殖させた。次いで、数ミリグラムのプラスミド DNA を大腸菌培養物から単離し、このプラスミド DNA を 2 種類の制限酵素  $Alu I$  および  $Hae I$  で処理した。これは大きさが約 6 塩基対から 600 塩基対 (DNA 配列分析による) までの範囲の約 3 7 の平滑末端二本鎖をプラスミド 1 つにつきもたらした。その後二本鎖の集団は  $dA_{10} : dT_{10}$  プローブを標識するとき使用した通常の 5'-および 3'-末端化法により標識付けした。ネオマイシンホストプラスミドから近位子は

の特徴的な 8 字状依存がそれぞれのプローブ濃度で観察され、そして蛍光強度変化の中間点はより低いプローブ濃度を使用する検定に対してより低い標的濃度で生じた。最も低いプローブ濃度 (5 pM プローブ) を使用する検定の場合は、蛍光変化の中間点が約 20 pM 標的だつた。これらの実験で使用した試料は、標準セミマイクロ蛍光キュベットを使用したもので 1 ml の容量であつた。これは 20 femole の標的 DNA に相当した。他の技法による DNA ハイブリダイゼーションはしばしば 10 μl 程度の容量を使用して行われる。同様の容量の使用を可能にする蛍光計のために試料キュベットを工夫することができ、その結果蛍光変化の中間点については 200 amole へと約 100 倍の感度の増加をもたらすであろう。この実験では 5 pM プローブを使用する最大蛍光変化が緩衝液の蛍光とほぼ同じ大きさであるので、感度の大きい増加はプローブ濃度をこれ以上低下させても期待されない。換言すれば、信号対ノイズの比は 1 に等しかつた。緩衝液のバックグラウンドは第 10 図に示

この初期実験を単純化するために、一般には選まれることだが、プラスミド pSP65 から遊離の状態でも単離しなかつた。この制限酵素切断プラスミドの数種の標識化調製物は表 3 に載っている。

第 11 図はネオマイシンホストプラスミドから近位子を含む DNA の濃度の未切断 pSP65 プラスミドを検索するために、表 3 に記載の第 1 のプラスミド調製物を用いて行つた融合のハイブリダイゼーションからのデータを示す。プラスミドプローブは 2.7 pM の完全プラスミドに対応する濃度で存在していた (標識化二本鎖の合計 100 pM)。水中のプローブおよび標的 DNA は沸騰水浴中に 12 分間置き、次に NaCl とリン酸カリウムの最終濃度をそれぞれ 1 M および 10 mM とするために 2 X 濃縮結合緩衝液を添加しながら室温まで冷却させた。

フルオレセイン放出は各試料について異なる時間で記録した。第 11 図にプロットしたデータは 1.5 時間および 5 時間で測定されたフルオレセインに相当する。両方のフルオレセイン値は予備

されたように標の濃度が増加するにつれて減少することが示されている。

試料に標の設置範囲は温度に測する蛍光変化の全範囲を示すには十分大きくないが、検定は使用したプローブの対応濃度に相当する少なくとも数ピコモルの濃度を示す。仮説的な  $1.0 \mu\text{M}$  試料では、数ピコモル濃度の約  $3.0 \text{ amole}$  に相当する。この実験において、フルオレセイン放出濃度はバクテグラウンドフルオレセインの大きさの程度よりも大きかった。

ハイブリダイゼーションはプラスミドのランダム制限消化から生ずるプローブの長さおよび広範囲の融解温度に関するプローブの不均一集団のために困難であることが予測される。それゆえに、出来るだけ均一な大きさのプローブ集団を作るべく制限酵素を注意深く選択することが有利であるだろう。クロニ化 DNA からこのような均一集団を作るために、ゲノム内に新しい制限部位を遺伝子操作により加えてもよい。

大腸菌エンテロトキシン遺伝子の検定を示す第

トキシン標を含む試料について第 12 図にプロットした。初期および最終蛍光値を記録することによって、試料間で変動するバクテグラウンド蛍光レベルから独立した蛍光変化が得られた。第 12 図のデータ記録は各組のデータが同じ初期蛍光値を含むように相対した。この効果は試料間で変動するバクテグラウンドを取り去ることである。各試料の蛍光変化は存在する標的 DNA の量に關係する。検出可能な最も低い標的濃度は  $4 \text{ pM}$  であることがわかった。従つて、仮説的な  $1.0 \mu\text{M}$  試料はこの濃度で  $4.0 \text{ amole}$  の標的を含むだろう。蛍光強度を時間と共に連続して記録することの 2 番目の利点は、蛍光変化の時間依存性が平衡値へのデータの外挿を可能にする運動学方程式にあてはめることができるので、より短いハイブリダイゼーション時間を使用し得るということである。蛍光変化の相対度は第 12 図に示す実験について 2 時間以内でつて  $\Delta$  濃分すればよい。

前記実験例は特定の蛍光値を記録したものであるが、本発明は他のアミン反応性蛍光団および化

12 図を今や参照すると、約  $1.0 \text{ pM}$  塩基対のエンテロトキシン遺伝子フラグメントから成る標的 DNA が pH 7.5 の  $1 \text{ mM EDTA}$  および  $1.0 \text{ mM}$  トリスを含む緩衝液  $7.0 \mu\text{M}$  中でラム DNA (キャリア DNA)  $1.4 \mu\text{M}$  と混合された。この溶液を沸騰水中中に 12 分間おき、その後  $3 \text{ } ^\circ\text{C}$  トキシンとして示した二本鎖プローブ DNA を加え、この溶液を沸騰水中に戻してさらに 2 分間加熱した。次いで蛍光計のサーモスタット付きキュベットホルダー内に収容された蛍光キュベット中の  $2 \times \text{NaCl}$  / リン酸緩衝液  $7.0 \mu\text{M}$  にこの溶液を加え、 $4.2 \text{ } ^\circ\text{C}$  (プローブの融解温度より  $25 \text{ } ^\circ\text{C}$  低い温度) に維持した。ラム DNA、塩化ナトリウムおよびリン酸カリウムの最終試料濃度はそれぞれ  $1.0 \mu\text{M}$  /  $\text{M}$ 、 $1 \text{ M}$  および  $0.01 \text{ M}$  であった。

蛍光強度は前の実験とは異なる方法で測定した。蛍光値は検出用エレクトロニクスにインタフェースで接続したコンピュータの使用 (物質および方法の部参照) により時間と共に連続して記録した。この方法で集めたデータは異なる濃度のエンテロ

学発光剤にも応用できる。アミン反応性蛍光団には例えば前述のフルオレセイン、ビレン、アクリジン、スルホホロダミン、エオシン、エリトロシンおよびそれらの誘導体が含まれる。アミン反応性化学発光剤には例えばミクロバクテリウム、ルミノール、イソルミノール、グルコースオキシダーゼ、アクリジニウムエスチルおよびそれらの誘導体が含まれる。

化学発光剤はプローブの化学発光機微成分が第 2 相補のプローブの蛍光と相互作用するように、蛍光と関連して本検定に用いられる。蛍光は機微成分が離れるまで化学発光剤の発光を抑えるだろう。発光反応を開始させるために、試料環境に適当な化学発光補助因子も加えられるだろう。標的がプローブと結合部位について競合したとき、機微成分は分離して化学発光剤または化学発光成分を発光させ、そして検出可能な信号を発生させることができる。

化学発光剤または化学発光補助因子との組合せで本発明に用いられる。こうして、第 1 プローブ

の化学発光標識成分は第2相補プローブ上の化学発光補助因子標識成分と相互作用するであろう。この系は特定強度の光を発する。暗的が存在する場合、標的のプローブと親合し、それにより第1および第2プローブおよび標識成分を分離し且つこの系の発光を抑制するだろう。

蛍光団標識化プローブはバックグラウンド発光を制限するために時間分解検定法において利用される。従つて、光パルスは第1蛍光団を励起するのに十分な波長で導入される。第1蛍光団はそのエネルギーを第2蛍光団に転移する。第1蛍光団から第2蛍光団へのエネルギーの転移および第2蛍光団によるエネルギーの放出は、直接発光に比べてゆっくりした過程である。第1蛍光団はエネルギー転移過程を引き起こすために、短い発光寿命を有するように選ばれる。材料はパルス後、そのパルスによつて開始された直接発光活性が終了した後、および転移したエネルギーが第2蛍光団から発せられる世間に、第2蛍光団からの光エネルギーについて監視することができる。エネルギー

を転移する位置にある蛍光群のみが監視される発光を生ずるだろう。相互作用する位置にある相補的プローブの標識成分のみが検出可能な信号をもち、それによりバックグラウンド発光が抑えられるだろう。

時間分解検定法の詳しい説明は本発明者の係属中の米国特許出願第738560号に開示されており、これは参照によりここに引用される。

こうして、本発明は均質な非放射性検定を特徴とする。本検定の均質性により、比較的短時間で検定を行うことができる。非放射性標識を使用する、特別の許可がなくても本検定を行うことができ、また検定技術および製造技術が単純化される。

本発明はその好適な実施態様について説明してきたが、本発明は変更および修飾が可能であり、それゆえに先に記載の細部に限定されるべきでなく、特許請求の範囲に含まれる種々の変更および修正を加え得ることを理解すべきである。

#### 4. [図面の簡単な説明]

第1図は本発明の親合のDNA検定を示す模式図であり；

第2図は本検定を行うための自動分析装置の略図であり；

第3図はクロニン化DNA由来の二本鎖プローブの作製を示す模式図であり；

第4図は二本鎖プローブの末端標識化を示す模式図であり；

第5図は相補プローブ類の標識成分が相互作用するときの発光放出と濃度の関係を示すグラフ（融解曲線）であり；

第6図は非融解プローブの融解曲線を示すグラフであり；

第7図は一定濃度の二本鎖プローブを含む異なる濃度の標的鎖についての発光強度と波長の関係を示すグラフであり；

第8図は親合のエネルギー転移DNAハイブリダイゼーションにおける標的濃度と発光放出の関係を示すグラフであり；

第9図はフルオレセイン-dA<sub>20</sub> : dT<sub>20</sub> -

レンプローブを用いた親合の検定における各種標的DNAの濃度とフルオレセイン発光強度の関係を示すグラフであり；

第10図は異なる濃度のフルオレセイン-dA<sub>20</sub> : dT<sub>20</sub> - レンプローブを用いた親合の標的ハイブリダイゼーションにおける標的DNA濃度と発光強度の関係を示すグラフであり；

第11図はネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含むpSP65プラスミドを検索するために、フルオレセイン-プラスミド-レンプローブを用いて行つた親合のハイブリダイゼーションからのデータを示し；そして

第12図は大腸菌エントロトキシン遺伝子の親合の検定を示す。

代理人 弁理士 謝 俊 恭



(外5名)



図面の添削(内容に変更なし)

図 1 DNA 検査

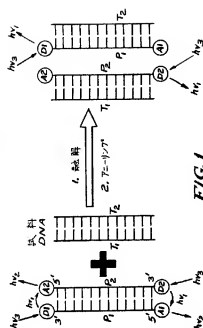


FIG. 1

FIG. 2

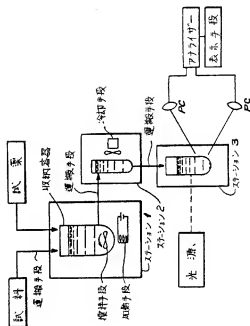


FIG. 3

クローニング DNA 由来の二本鎖プロンプ

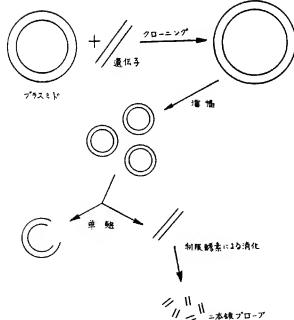
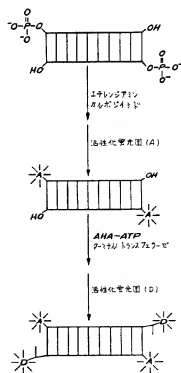


FIG. 4

二本鎖プロンプの末端標識化



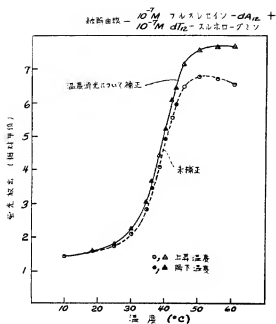


FIG. 5

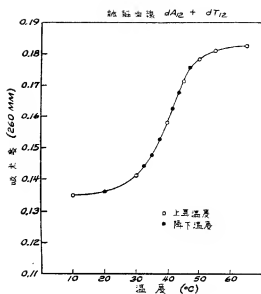


FIG. 6

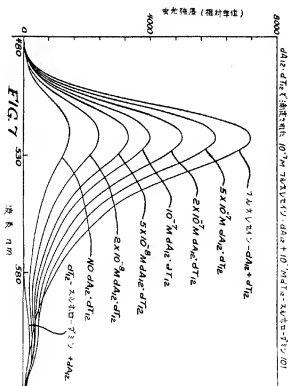


FIG. 7

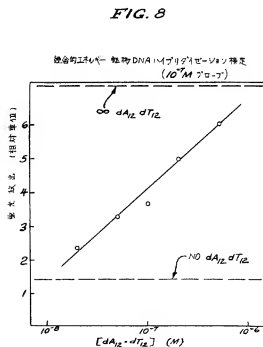
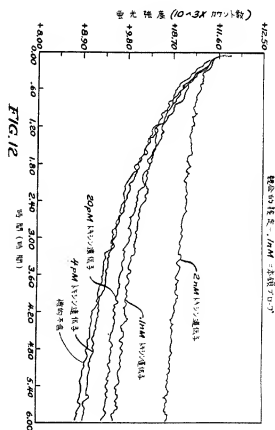
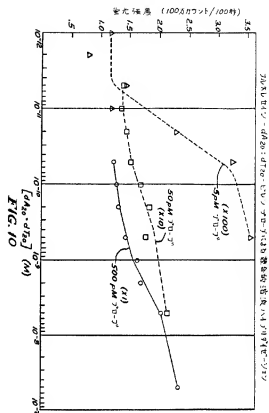
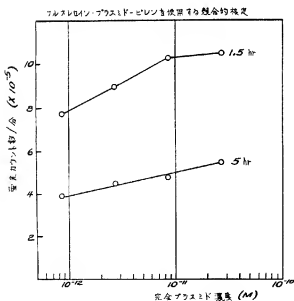
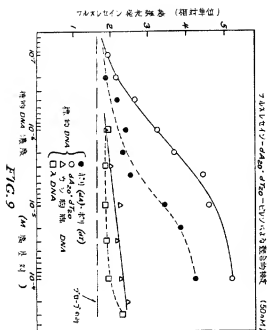


FIG. 8



手続補正書

昭和62年3月3日

特許庁長官 黒田明雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和62年特許願第3905号

## 2. 発明の名称

融合的均質検定法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

名 称 アモコ・コーポレーション

## 4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206号室

電 話 270-6641-6

氏 名 (2770) 弁理士 堀 浅 恭

## 5. 補正の対象

タイプした明細書

## 6. 補正の内容

別紙の通り(尚、明細書の内容には変更なし)



手続補正書(方式)

昭和62年4月30日

特許庁長官 黒田明雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和62年 特許 願第 3905 号

## 2. 発明の名称

融合的均質検定法

## 3. 補正をする者

事件との関係 出 願 人

住 所

名 称 アモコ・コーポレーション

## 4. 代理人

住 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル 206号室

氏 名 (2770) 弁理士 堀 浅 恭

## 5. 補正命令の日付 昭和62年3月31日(発送日)

## 6. 補正の対象

適正な図面

方式 (明)

## 7. 補正の内容

別紙の通り(内容に変更なし)

